

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

Rec'd PCT/PTO 22 FEB 2005  
PCT 03/07805 #2  
107525685

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 04 SEP 2003  
WIPO PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 102 38 257.3

**Anmeldetag:** 21. August 2002

**Anmelder/Inhaber:** Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Mainz/DE;  
Freistaat Bayern vertreten durch die Julius-  
Maximilian-Universität Würzburg, Würzburg/DE.

**Bezeichnung:** Sorbicillacton A und Sorbicillacton-A-Derivate,  
Verfahren zu ihrer Herstellung, sie enthaltende  
Arzneimittel und deren Verwendung

**IPC:** C 07 D, A 61 K

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 31. Juli 2003  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
Im Auftrag

Stück

**Sorbicillacton A und Sorbicillacton-A-Derivate, Verfahren zu ihrer  
Herstellung, sie enthaltende Arzneimittel und deren Verwendung**

**Beschreibung**

5 Die vorliegende Erfindung betrifft neue bioaktive Verbindungen aus marinen Organismen, die als Sorbicillacton A bezeichnet werden und deren Derivate. Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung der Verbindungen, diese enthaltende Arzneimittel und deren Verwendung bei der Behandlung von Erkrankungen. Darüber hinaus wird eine Synthese von  
10 Sorbicillacton A und deren Derivaten beschrieben.

**Hintergrund der Erfindung**

Marine eukaryontischen Organismen, speziell Schwämme, Hydrozoen, Bryozoen und Tunikaten, stellen eine sehr reiche Quelle für bioaktive  
15 Substanzen dar (Sarma AS, Daum T, Müller WEG (1993) Secondary metabolites from marine sponges. Akademie gemeinnütziger Wissenschaften zu Erfurt, Ullstein-Mosby Verlag, Berlin). Grund hierfür ist die Tatsache, daß diese Vielzeller sessile Organismen sind, die sich aus dem im Umgebungsmilieu vorhandenen Mikroorganismen ernähren. Hierfür brauchen  
20 sie effiziente Abwehrmechanismen, um sich vor Bakterien- und Pilzinfektionen zu schützen. Die aktivsten Abwehrsubstanzen stellen solche sekundäre Metabolite dar, die von den Symbionten gebildet werden, die in den marinen eukaryontischen Organismen vorkommen. Deshalb bleibt es in den meisten Fällen bis heute unklar, ob der Wirt (Schwämme, Hydrozoen, Bryozoen und  
25 Tunikaten) oder die mit ihnen häufig in eine Symbiose lebenden Mikroorganismen (Pilze, Bakterien) die Produzenten für die bioaktiven Substanzen sind (Althoff et al. (1998) Marine Biol 130:529-536; Wiens et al., Marine Biol.; im Druck). In den letzten Jahren hat sich auch erwiesen, daß Schwämme Abwehrmechanismen besitzen, um Viren zu eliminieren  
30 (Grebjenjuk et al. (2002) Europ. J. Biochem. 269: 1382-1392). Folglich ist es ein Hauptziel in den Forschungen, diese Mikroorganismen in Kultur zu züchten und sie dort ihre bioaktiven Substanzen produzieren zu lassen.

Es kann heute angenommen werden, daß weniger als 5% der in marinen

eukaryontischen Organismen vorkommende Bakterien und Pilze kultivierbar sind. Folglich ist auch deren Potential noch nicht genutzt. Zur erfolgreichen nachhaltigen Nutzung des bioaktiven Potentials ist es deshalb notwendig, optimale Kultivierungsmethoden für Mikroorganismen zu entwickeln, mit hoher Ausbeute die bioaktiven Substanzen aus dem Medium zu gewinnen, um diese mit effizienten Reinigungs- und Charakterisierungsverfahren zu identifizieren. Bis heute ist nur ein Medikament in die klinische Therapie eingeführt, das von marinen eukaryontischen Organismen produziert wird, das 9- $\beta$ -D-Arabinofuranosyladenosin [araA] (Müller et al. (1977) Ann. New York Acad Sci 284:34-48).

Das Anwendungsspektrum für eine kommerzielle Nutzung der bioaktiven Sekundärmetabolite ist breit und reicht von einer Behandlung von Tumoren, von neurodegenerativen Erkrankungen bis zur Therapie von Infektionen hervorgerufen von Bakterien, Viren und/oder Pilzen.

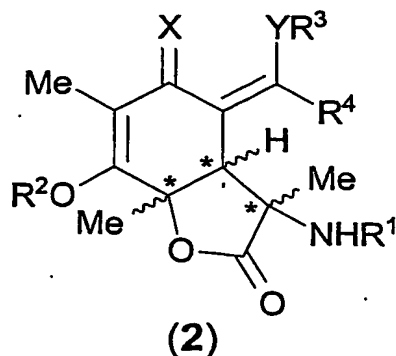
Intensiv wird nach solchen bioaktiven Substanzen gefahndet, die eine hohe Spezifität gegen definierte Tumoren entfalten und gleichzeitig opportunistische Infektionen, z.B. durch Viren, eindämmen.

Es ist daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine neue bioaktive Substanz aus einem marinen Organismus, ein Verfahren zu dessen Herstellung und dessen Verwendungen zur Verfügung zu stellen.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe zunächst durch das zur Verfügung stellen als Sorbicillacton A und Sorbicillacton-A-Derivate bezeichneter bioaktiver Substanzen gelöst. Sorbicillacton A ist ein Naturstoff, der bisher noch nicht beschrieben wurde. Deshalb ist auch sein Wirkspektrum noch weitgehend unbekannt. In der Literatur sind auch keine zu Sorbicillacton A verwandten Substanzen beschrieben worden.

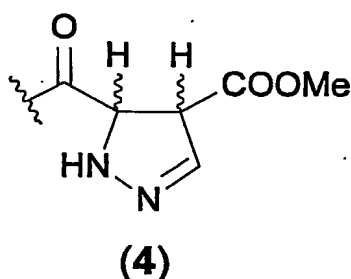
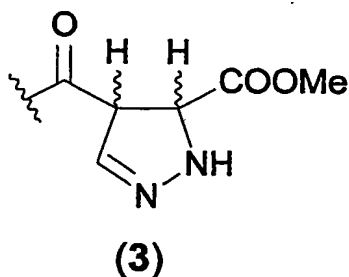
Es wurde weiterhin gefunden, daß Sorbicillacton A und die abgeleiteten Sorbicillacton-A-Derivate der allgemeinen Formeln (1) und (2) ausgeprägte antitumorale und antivirale Eigenschaften besitzen. Erfindungsgemäß werden

somit Verbindungen der allgemeinen Formel (2):



5 worin

R<sup>1</sup> ist ausgewählt aus: -H, (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)-Alkyl, wobei Alkyl gerade oder verzweigt ist, (C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>)-Alkenyl oder eine Acylgruppe (z.B. Formyl, Acetyl, Trichloracetyl, Fumaryl, Maleyl, Succinyl usw.), wobei eventuelle freie -COOH-Gruppen an dieser Acylgruppe auch in Form von Estern (z.B. eines Methylesters, -COOMe) vorliegen können oder R<sup>1</sup> gegebenenfalls auch einer der beiden heterocyclischen Acylsubstituenten (3) oder (4) sein kann

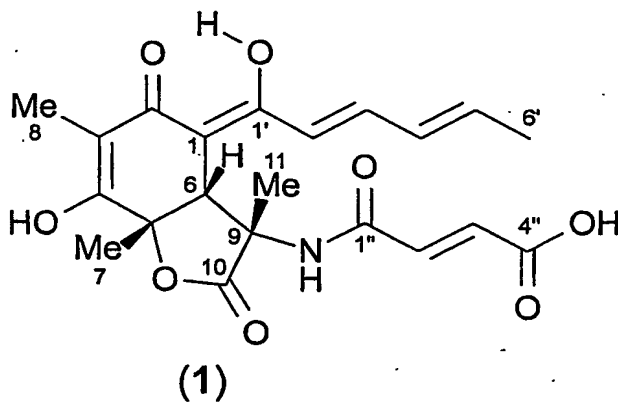


- 15 R<sup>2</sup> ausgewählt ist aus: -H, (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)-Alkyl, wobei Alkyl gerade oder verzweigt ist oder einer Acylgruppe (z.B. Formyl, Acetyl usw.);  
 R<sup>3</sup> ausgewählt ist aus: -H, (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)-Alkyl, wobei Alkyl gerade oder verzweigt ist oder eine Acylgruppe (z.B. Formyl, Acetyl usw.);  
 R<sup>4</sup> ausgewählt ist aus: (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)-Alkyl, wobei Alkyl gerade oder verzweigt ist  
 20 oder (C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>)-Alkenyl, wobei der Alkenylrest entweder eine oder mehrere Doppelbindungen enthalten kann;  
 X ausgewählt ist aus O, S, NOH oder NOR<sup>5</sup>, wobei R<sup>5</sup> ein geradekettiges oder verzweigtes (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl ist;

Y entweder O ist oder Y und X sind zwei miteinander verbundene N-Atome, die somit einen Pyrazolring bilden.

und wobei die Verbindung als (R,R,R)-, (R,R,S)-, (R,S,R)-, (R,S,S)-, (S,R,R)-, (S,R,S)-, (S,S,R)- und (S,S,S)-Stereoisomer vorliegen kann und pharmazeutisch verträgliche Salze oder Solvate von (2) zur Verfügung gestellt.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist dabei eine Verbindung mit der Formel (1):



(Sorbicillacton A) oder Derivate davon, deren Diastereomere, sowie die entsprechenden Enantiomere und pharmazeutisch verträgliche Salze oder Solvate dieser Verbindung.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung soll unter einem "Derivat" eine von der allgemeinen Formel (2) abgeleitete Verbindung sein, die zum Beispiel durch verschiedene der oben für R<sub>1</sub> bis R<sub>4</sub> und X oder Y angegebenen Restgruppen substituiert ist, sowie Gemische verschiedener dieser Verbindungen, die zum Beispiel zu einem auf die jeweils zu therapierende Erkrankung und/oder den Patienten auf Basis von diagnostischen oder Daten über den Behandlungserfolg oder -verlauf abgestimmten "personalisierten" Medikament verarbeitet werden können. Unter einem Derivat wird auch eine Verbindung der Sorbicillacton A-Klasse verstanden, die aus anderen (z.B.) marinen Organismen isoliert werden kann, als den hier (beispielhaft) erwähnten.

Unter einem "Vorläufer" einer Substanz soll im Rahmen der vorliegenden Erfindung zum einen eine Substanz verstanden werden, die im Laufe ihrer Verabreichung zur Behandlung durch die Bedingungen im Körper (z.B. pH im Magen, oder ähnliches) so verändert wird, oder aber durch den Körper nach Aufnahme so metabolisiert wird, daß sich als wirksame Substanz die erfindungsgemäße Verbindung oder deren Derivate bilden. Zum anderen werden als Vorläufer aus Organismen isolierte Derivate von Sorbicillacton A verstanden, die als Ausgangsprodukte zur Synthese der Verbindung in dem jeweiligen Organismus dienen und bereits die hierin angegebenen Eigenschaften des Sorbicillacton A aufweisen.

Es wurde nun gefunden, daß Sorbicillacton A und die von dieser Substanz abgeleiteten Sorbicillacton-A-Derivate eine ausgeprägte und nicht vorhersehbare antitumorale und antivirale Eigenschaft besitzen. Weiterhin wurden überraschenderweise entzündungshemmende Eigenschaften der neuen Substanz gefunden. Aufgrund dieser Eigenschaften und basierend auf dem Befund, daß Sorbicillacton A und die Sorbicillacton-A-Derivate weitgehend nicht toxisch für Säugetiere (Beispiel Maus) sind, sind die hier beschriebenen Substanzen geeignet zur Behandlung von Tumoren und Viruserkrankungen. Es wird empfohlen, diese Substanzen entweder in der vorliegenden Form oder in Form einer Depotsubstanz oder als Vorläufer zusammen mit einer geeigneten, pharmazeutisch verträglichen Verdünnungslösung oder Trägersubstanz anzuwenden.

Aus marinen Quellen, Invertebraten und auch Mikroorganismen, ist bereits eine Vielzahl von Naturstoffen beschrieben. Für die Suche nach neuen biologisch aktiven Verbindungen ist daher eine effiziente Dereplikation nötig, das heißt, bekannte Stoffe sollten bereits in einer frühen Phase des Arbeitsprozesses aufgefunden und eindeutig identifiziert werden. Zu diesem Zweck eignet sich besonders die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) in Kopplung mit verschiedenen spektroskopischen Detektionsmethoden. Besonders leistungsfähig ist hier die 'LC-Triade', eine Kopplung von HPLC mit NMR, MS, und CD (Bringmann et al. (1998) Anal. Chem. 70:2805-2811; Bringmann et al. (1999) Anal. Chem. 71:2678-2686).

Die damit erhaltenen spektroskopischen Daten von Extraktinhaltsstoffen, ohne eigentliche Isolierung der einzelnen Verbindungen, ermöglichen durch Suche in Datenbanken die eindeutige Identifizierung schon bekannter Substanzen. Darüber hinaus ist unter geeigneten Umständen sogar die  
5 Aufklärung der vollständigen Stereostruktur unbekannter Naturstoffe, ohne vorherige Isolierung, möglich.

Sorbicillacton A ist ein Naturstoff und Sorbicillacton-A-Derivate sind davon abgeleitete Syntheseprodukte, die bisher unbekannt waren und deren  
10 Wirkung nicht beschrieben ist.

Diese erfindungsgemäßen Verbindungen können mit den üblichen Lösungsmitteln, Hilfs- und Trägerstoffen zu Tabletten, Dragees, Kapseln, Tropflösungen, Suppositorien, Injektions- und Infusionszubereitungen  
15 verarbeitet werden, um therapeutisch zur peroralen, rektalen oder parenteralen Applikation Verwendung zu finden.

~~6.~~ Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung einer oben genannten Verbindung, das dadurch gekennzeichnet  
20 ist, daß die Substanz bevorzugt aus einem marinen Organismus, wie zum Beispiel einem in einem marinen Schwamm als Symbiont wachsenden Pilz der Gattung *Penicillium* isoliert wird. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde ein Pilz der Gattung *Penicillium* (vorzugsweise *Penicillium chrysogenum*) erstmalig als Produzent der erfindungsgemäßen Verbindungen  
25 nachgewiesen. Sorbicillacton A wird unter den nachstehend aufgeführten Kulturbedingungen sowohl in das Kulturmedium abgegeben, als auch vor allem in der Pilzbiomasse akkumuliert. Bei dem Pilz handelt es sich um einen Vertreter der Gattung *Penicillium* LINK (1809), die als anamorphe Trichocomacae / Deuteromycetes / Mitosporic Fungi, code group 1.A2.15  
30 systematisch charakterisiert ist. Diese Gattung zeichnet sich durch eine Vielzahl weit verbreiteter Spezies aus, die zum Teil beachtliche biochemische Potenzen besitzen. Bei der vorliegenden Species handelt es sich um eine seit 1910 bekannte Art, die bisher als Bewohner terrestrischer Biotope beschrieben ist. Die vorliegende Pilzisolation (Pilzstamm) entstammt jedoch

dem marin-aquatischen Lebensraum und wurde von dem marinen Schwamm *Ircinia fasciculata* (Porifera) isoliert. Aufgrund der im Rahmen dieser Erfindung erfolgten Strukturaufklärung läßt sich die erfindungsgemäße Verbindung jedoch auch mittels herkömmlicher Synthesechemie herstellen, bzw. zu

5 Derivaten und/Vorläufern modifizieren. Bevorzugt ist dabei als weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur biomimetischen Synthese einer erfindungsgemäßen Verbindung, bei dem zunächst Sorbicillin und/der

Derivate davon zur Verfügung gestellt werden, dann auf an sich bekannte Weise eine oxidative Dearomatisierung und anschließende Addition von

10 Alanin (im Falle von Sorbicillin A) oder anderen Aminosäuren und deren Analoga (für andere Derivate von Sorbicillin) durchgeführt wird, und eine anschließende Anknüpfung von Fumarsäure (im Falle von Sorbicillin A) oder analogen Acylresten (für andere Derivate von Sorbicillin) erfolgt.



15 Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung mindestens einer der oben genannten Verbindungen zur Behandlung von Erkrankungen, wie z.B. Tumor- und/oder Viruserkrankungen und/oder zur Behandlung von Entzündungszuständen. Diese Verwendung kann zum Beispiel in Form einer Depotsubstanz oder als Vorläufer zusammen mit einer

20 geeigneten, pharmazeutisch verträglichen Verdünnungslösung oder Trägersubstanz erfolgen. Im Falle der Behandlung von HIV-1 assoziierten Erkrankungen ist eine Behandlung in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,3 und 3,0 µg/ml bevorzugt, im Falle der Behandlung von Entzündungen eine Konzentration von ungefähr 2 µg/ml. Bei der Behandlung von Ödembildung

25 wird normalerweise eine Menge von ungefähr 20 µg der oben genannten Verbindung verwendet. Ein weiterer Aspekt ist die Verwendung einer oder mehrerer der erfindungsgemäßen Verbindung(en) Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Tumor- und/oder Viruserkrankungen und/oder zur Behandlung von Entzündungszuständen. Diese Herstellung

30 kann analog zu der oben beschriebenen Weise erfolgen und in den oben beschriebenen Konzentrationen und für die oben u.a. beschriebenen Anwendungen erfolgen.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft eine pharmazeutische



Zusammensetzung, umfassend eine erfindungsgemäße Verbindung, zusammen mit geeigneten Zusatz- oder Hilfsstoffen. Diese pharmazeutische Zusammensetzung kann dadurch gekennzeichnet sein, daß die Verbindung in Form einer Depotsubstanz oder als Vorläufer zusammen mit einer geeigneten, pharmazeutisch verträglichen Verdünnungslösung oder Trägersubstanz vorliegt.

Besonders bevorzugt sind pharmazeutische Zusammensetzung, in denen die erfindungsgemäße Verbindung in einer Menge von 20 µg vorliegt (besonders geeignet zur Behandlung von Ödembildung) oder pharmazeutische Zusammensetzungen, in denen die erfindungsgemäße Verbindung in solch einer Menge vorliegt, daß ein Konzentrationsbereich zwischen 0,3 und 3,0 µg/ml bei der Behandlung in vivo vorliegt (besonders geeignet zur Behandlung von viralen und/oder Entzündungserkrankung).

Bevorzugt ist eine pharmazeutische Zusammensetzung gemäß der vorliegenden Erfindung, die weitere Chemotherapeutika enthält. Diese Chemotherapeutika können alle für den Fachmann üblichen Chemotherapeutika im Rahmen einer Krebstherapie umfassen (z.B. Taxol oder andere).

Erfindungsgemäß kann die oben genannte pharmazeutische Zusammensetzung in Form von Tabletten, Dragees, Kapseln, Tropflösungen, Suppositorien, Injektions- oder Infusionszubereitungen zur peroralen, rektalen oder parenteralen Verwendung vorliegen. Solche Darreichungsformen und deren Herstellung sind dem Fachmann bekannt.

Die Verfahrensprodukte der allgemeinen Formeln (1) und (2) besitzen wertvolle pharmakologische Eigenschaften. Die Antitumorwirkung wurde u.a. am L5178y-Mäuselymphomzellsystem nachgewiesen (ATCC CRL 1722). Diese Zellen wurden in Suspensionskultur gehalten, wie bereits früher beschrieben (Müller et al. (1979) Cancer Res. 39: 1102-1107). Die ED<sub>50</sub>-Konzentrationen für Sorbicillacton A (Inokulation: 10.000 Zellen/ml; Inkubationszeit: 72 Std.) lag bei diesen Tumor-Zellstämmen bei  $2.2 \pm 0.3$

µg/ml. Etwas geringer wirksam war Sorbicillacton A bei den Tumorzell-Linien PC-12 (adrenaler, phaeochromocytomaler Tumor [Ratte]; ATCC CRL 1721), Sarcoma 180 (Mäuse-Sarkom; ATCC TIB 66) und HeLa S3 (epitheloides Carcinom [Cervix; Mensch]; ATCC CCL 2.2) mit ED<sub>50</sub>-Konzentrationen  
5 zwischen 8 und 15 µg/ml.

Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Behandlung einer Erkrankung, ausgewählt aus Tumor- und/oder Viruserkrankungen und/oder Entzündungszuständen, die das Verabreichen einer  
10 erfindungsgemäßen Verbindung, etwa in Form einer erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung, umfaßt. Die Verabreichung kann erfindungsgemäß in Form einer Depotsubstanz oder als Vorläufer zusammen mit einer geeigneten, pharmazeutisch verträglichen Verdünnungslösung oder Trägersubstanz erfolgen.

Besonders bevorzugt ist ein Verfahren zur Behandlung, bei dem die Viruserkrankung eine HIV-1-Infektion ist. Dabei kann die Verbindung in einem Konzentrationsbereich in vivo zwischen 0,3 und 3,0 µg/ml erfolgen. Dem Fachmann sind die für die Erreichung dieser Konzentrationen erforderlichen  
20 zu verabreichenden Mengen leicht ersichtlich, die u.a. von dem jeweiligen Patienten, der Erkrankung und der Bioverfügbarkeit der jeweils verwendeten Verbindung abhängen können. Als weitere zu therapierende virale Erkrankungen seien hier beispielhaft weitere HIV-Infektionen, Infektionen mit HCV (Hepatitis C-Virus), Herpes- und/oder RSV-Virus-Erkrankungen genannt.

Weiterhin bevorzugt ist ein Verfahren zur Behandlung einer Erkrankung, wobei eine Entzündung behandelt wird. Dabei kann die Verbindung analog zur Verabreichung bei viralen Erkrankungen in einer Konzentration von 2 µg/ml in vivo verabreicht werden. Eine weitere mögliche Behandlung ist die  
30 Therapie einer Ödembildung. Dabei kann eine erfindungsgemäße Verbindung in einer Menge von 20 µg verabreicht werden.

Von besonderer Bedeutung für die Verwendung der Verfahrensprodukte zur Chemotherapie von Tumorerkrankungen als auch für die antivirale Therapie

ist die Tatsache, daß eine zytostatische Wirksamkeit auf nicht-tumorale Zellen in Kultur bei therapeutisch anzuwendenden Konzentrationen fehlt. Dieser Schluß wurde aus Versuchen mit Lymphozyten-Kulturen gezogen: Milz-Lymphozyten wurden von sechs Wochen alten NMRI-Mäusen gewonnen; die Erythrozyten wurden aus der Suspension durch Ammoniumchlorid-  
5 Behandlung entfernt. Die Milz-Lymphozyten wurden in RPMI 1640-Medium mit 20% fötalem Kälberserum in einer Dichte von  $1,5 \times 10^7$  Zellen/ml für 72 Std. in Anwesenheit von 2 µg/ml Concanavalin A gehalten. 18 Std. vor Ende des Versuches wurde [ $^3$ H]-Thymidin hinzu gegeben. Bei einer Inkubation mit  
10 15 µg/ml der Verfahrensprodukte wurde keine Beeinträchtigung der DNA-Syntheserate gemessen. In Gegenwart von 20 µg/ml erfolgte eine lediglich 20%ige Hemmung der Einbaurate von [ $^3$ H]-Thymidin in die DNA.

Die subakute Toxizität von Sorbicillacton A und seinen Derivaten liegt bei  
15 einer fünftägigen i.p.-Behandlung von Mäusen mit Werten bei  $\gg 20$  mg/kg so günstig, daß eine Verwendung der Verfahrensprodukte bei einer Chemotherapie von Krebserkrankungen aussichtsreich ist.

Die ausgeprägte antivirale Wirksamkeit der Verfahrensprodukte wurde im  
20 HTLV-III B (HIV-1) Testsystem nachgewiesen. Eine spezifische Hemmung der Virus-Produktion wurde bei einem Konzentrationsbereich zwischen 0,3 und 3,0 µg/ml ermittelt.

Darüber hinaus entfalten Sorbicillacton A und Sorbicillacton-A-Derivate  
25 ausgeprägte entzündungshemmende Eigenschaften. Diese Effekte konnten sowohl *in vitro* (Modell: Hemmung der Phospholipase A2 [aus Bienengift]) als auch *in vivo* (Modell: Mäuse-Ohr Ödem) gemessen werden. In *In-vitro*-Versuchen mit Phospholipase A2 (aus Bienengift) konnte gezeigt werden, daß bei einer Konzentration von 2 µg/ml eine nahezu 80%-ige Hemmung erzielt  
30 werden. Weiterhin wurde der Effekt von Sorbicillacton-A auf das Mäuseödem gemessen. Das Ödem wurde bei den Mäusen (Swiss; etwa 25 g) mit TPA (10 µg) induziert. TPA wurde in Aceton gelöst und topisch auf die rechte innere Ohrmuschel aufgebracht. Die linke innere Ohrmuschel diente als Kontrolle (Aceton-Kontrolle). Durch cervikale Dislokation wurden die Tiere nach 4

Stunden getötet und die Ödembezirke ausgeschnitten. Diese wurden anschließend gewogen. Das Verhältnis zwischen dem Gewicht des behandelten Gewebes zu der Kontrolle diente als Maß für den Sorbicillacton-A-Effekt (Carlson RP et al. (1985) Agents Actions 17: 197-204). Die  
5 Wirksubstanz wurde gewöhnlich 10 min nach der TPA-Behandlung topisch auf die behandelte Stelle aufgebracht. Die Kontrollen entwickelten nach 3 Stunden ein Ödem von  $12,3 \pm 0,9$  mg. Der Effekt von Sorbicillacton A auf die Ödembildung war signifikant ( $P \leq 0,01$ ); bei einer Behandlung mit  $20 \mu\text{g}$  wurde eine  $39,2 \pm 5,3\%$ -ige Hemmung erzielt ( $n = 5$ ).

10 Die Erfindung soll nun im folgenden anhand von Beispielen näher verdeutlicht werden, ohne jedoch auf diese Beispiele irgendwie beschränkt zu sein.

**Beispiel 1: Gewinnung der Substanz Sorbicillacton A aus biologischen  
15 Material.**

Ein Pilz der Gattung *Penicillium* (vorzugsweise *Penicillium chrysogenum*) wird erstmalig als Produzent des neuen Naturstoffes Sorbillacton A nachgewiesen. Sorbicillacton A wird unter den nachstehend aufgeführten Kulturbedingungen sowohl in das Kulturmedium abgegeben als auch vor allem in der  
20 Pilzbiomasse akkumuliert. Bei dem Pilz handelt es sich um einen Vertreter der Gattung *Penicillium* LINK (1809), die als anamorphe Trichocomaceae / Deuteromycetes / Mitosporic Fungi, code group 1.A2.15 systematisch charakterisiert ist. Diese Gattung zeichnet sich durch eine Vielzahl weit verbreiteter Species aus, die zum Teil beachtliche biochemische Potenzen  
25 besitzen. Bei der vorliegenden Species handelt es sich um eine seit 1910 bekannte Art, die als Bewohner terrestrischer Biotope beschrieben ist. Die vorliegende Pilzisolierung (Pilzstamm) entstammt jedoch dem marin-aquatischen Lebensraum und wurde von dem marinen Schwamm *Ircinia fasciculata* (Porifera) isoliert.

30 **Beschreibung des allgemeinen Verfahrens der Isolierung und Anzucht des Pilzes**

Anschließend wird das gewachsene Mycel einschließlich der Kulturbrühe abgeerntet, mit 40 ml Ethylacetat pro 300 ml Kulturbrühe versetzt und bei -86°C tiefgefroren.

5 Zur Extraktion werden vorzugsweise Methanol, Dichlormethan und Essigester eingesetzt, es sind aber auch andere Lösungsmittel wie Ethanol, Propanol, Butanol, Ether, n-Hexan, Benzin, Toluol, Aceton, Methylethylketon, Essigsäure-Tertiärbutylester denkbar. Die erhaltenen Extrakte werden im Vakuum bis zur Trockne eingeeengt und, eventuell nach Vorfraktionierung  
10 durch Flüssig-Flüssig-Extraktion, mit Hilfe eines oder mehrerer chromatographischen Verfahren aufgetrennt. Vorzugsweise wird hierfür die präparative HPLC an 'reversed-phase'-Material (RP<sub>18</sub>) mit einem Wasser/Acetonitril- oder einem Wasser/Methanol-Gradienten verwendet. Als stationäre Phasen könnten auch Siliciumdioxid, Aluminiumoxid oder Cellulose  
15 Verwendung finden oder es könnte Flüssig-Flüssig-Chromatographie, z.B. HSCCC, eingesetzt werden. Es werden verschiedene Fraktionen gesammelt und durch HPLC oder Dünnschichtchromatographie auf ihren Gehalt an den erfindungsgemäßen Verbindungen untersucht. Nach Einengen der in Frage kommenden Fraktionen erhält man die Verbindungen in reiner Form.

20

## **Beispiel 2: Beispiele für die erfindungsgemäßen Verbindungen.**

### **Isolierung von Sorbicillacton A**

Der vorliegende Pilzstamm von *Penicillium* wurde am 02.05.2001 aus dem marinen Schwamm *Ircinia fasciculata* aus 17,5 m Wassertiefe in der Bucht von Fetovaia (42°43'24"N/10°09'31"E) auf Elba, Italien, isoliert. Der  
25 Schwamm wurde sofort nach der Entnahme mit Hilfe einschlägiger marin-mykologischer Methoden auf seinen Pilzbesatz hin untersucht. Die vorliegende Isolation wurde durch Auslegen kleiner Gewebestückchen des seziierten Schwammes auf einer Nähragarplatte folgender Zusammensetzung  
30 (CYAS, nach Pitt 1973) gewonnen:

Czapek-Yeast Extract-Agar + Seawater:

30 g Saccharose

5 g Yeast Extract

3 g  $\text{NaNO}_3$

1 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

10 ml Mineral-Lösung:

5 g KCl, 5g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  / 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$

5 1 ml Spurenmetall-Lösung:

1 g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  / 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$

Antibiotika

1000 ml Meerwasser (30-33 PSU)

10 Durch mehrere Reinigungsstufen wurde die primäre Rohkultur zu einer axenischen Reinkultur weitergezüchtet. Die Stammkultur erfolgt auf Schrägagarröhrchen folgender Zusammensetzung (GPYNS, Schaumann 1974):

15 Glucose-Pepton-Hefeextrakt-Ammoniumnitrat-Meerwasser-Agar:

1,0 g Glucose

0,5 g Pepton

0,1 g Hefeextrakt

1,0 g Ammoniumnitrat

20 15,0 g Agar

1000 ml Meerwasser (30-33 PSU)

$\text{pH}$  7,2-7,4

25 Die Anzucht der Pilzkultur für die Gewinnung des neuen Naturstoffes Sorbicillacton A erfolgt in 1-L-Erlenmeyerkolben, die mit je 300 ml Nährlösung folgender Zusammensetzung (WS, nach Wickerham 1951) beschickt wurden:

Wickerham-Meerwasser-Medium:

30 3,0 g Hefeextrakt

3,0 g Malzextrakt

5,0 g Pepton

10,0 g Glucose

1000 ml Meerwasser (30-33 PSU)

$\text{pH}$  7,2-7,4

Die Sterilisation der Nährlösung erfolgt durch Autoklavieren bei 121°C/1 bar, 15 Minuten. Als Inokulum für die experimentelle Pilzkultur dienen zehn Stück Mycelscheibchen (Durchmesser 5 mm) je Kolben. Diese werden aus einer 7  
5 Tage alten Vorkultur auf WS-Agar mit Hilfe eines Korkbohrers ausgestanzt und in die Nährlösung übertragen. Die Inkubation der beimpften Kolben erfolgt über einen Zeitraum von 14 Tagen bei Raumtemperatur oder auch konstant 20°C in statischer Kultur im Dunkeln. Anschließend wird das gewachsene Mycel einschließlich der Kulturbrühe abgeerntet, mit 40 ml  
10 Ethylacetat pro 300 ml Kulturbrühe versetzt und bei -86°C tiefgefroren.

Bei drei 300-ml-Kulturansätzen wurde das Mycel vom Kulturmedium durch Filtration getrennt, zerkleinert und mit 250 ml eines Dichlormethan-Methanol-Gemisches (1:1) unter Rühren für 48 h extrahiert. Anschließend wurde das  
15 Mycel durch Zentrifugation abgetrennt und der Extrakt im Vakuum zur Trockne eingeeengt. Das Kulturfiltrat wurde dreimal mit je 250 ml Essigester extrahiert, die Essigesterphasen vereinigt und ebenfalls im Vakuum zur Trockne eingeeengt. Kulturfiltrat- und Mycelextrakt wurden zusammen in einem Gemisch aus 200 ml Methanol und 6 ml Wasser gelöst und mit 200 ml  
20 Petrolether extrahiert. Die Petroletherphase wurde verworfen, die Methanol-Wasser-Phase im Vakuum eingeeengt und mittels HPLC-UV, -NMR und -MS untersucht. Durch Vergleich der so gewonnenen spektroskopischen Daten verschiedener Inhaltsstoffe mit Datenbanken konnten verschiedene bekannte Verbindungen, z.B. Meleagrin und Roquefortin C, identifiziert werden. Eine  
25 der Verbindungen wurde auf diese Weise als neuer, bisher unbekannter Naturstoff erkannt. Da zweidimensionale HPLC-NMR-Experimente am Extrakt, z.B. HPLC-WET-COSY und HPLC-WET-ROESY, zeigten, daß es sich hierbei um eine hochinteressante Struktur handelte, wurde diese Verbindung durch präparative HPLC isoliert:

30 Säule: Waters SymmetryPrep C18, 19 x 300 mm

Eluent: Acetonitril + 0.05% TFA, Wasser + 0.05% TFA

Gradient: von 10% Acetonitril auf 100% Acetonitril in 30 min

Fluß: 11 ml/min

Detektion: 254 nm

Sorbicillacton A eluierte zwischen 19 und 20 min. Die entsprechenden Fraktionen wurden gesammelt und im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Man erhielt 6 mg eines gelben, amorphen, in Methanol löslichen Feststoffs.

## 5 Strukturaufklärung der Verbindung

Das gewonnene Sorbicillacton A hat folgende in Tabelle zusammengefaßten spektroskopische Eigenschaften:

**Tabelle 1:**

10 NMR-Daten von Sorbicillacton A (ca. 6 mg in THF-d<sub>8</sub>; 600MHz)

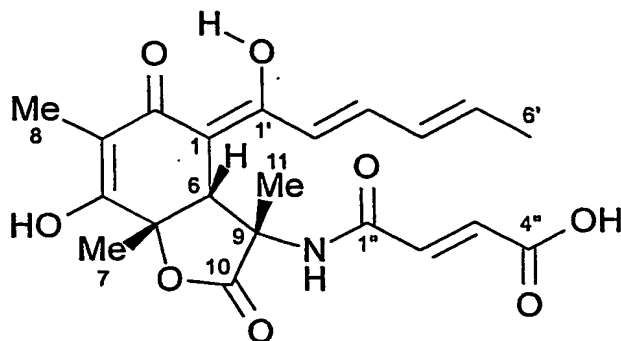
Position	<sup>13</sup> C [ppm]	<sup>1</sup> H [ppm]	COSY	HMBC	ROESY
1	99.55				
2	192.10				
3	110.92				
4	166.53				
5	80.98				
6	53.00	3.43, s		1, 2, 4, 5, 7, 9, 11, 1'	7, 11, 2'
7	~25.00	1.55, s		5, 6	6
8	7.29	1.54, s		2, 3, 4	
9	59.98				
10	172.98				
11	~26.00	1.42, s		6, 9, 10	NH, 6, 2'
1'	169.72				
2'	121.68	6.38, d	3' (14,7 Hz)	1', 4'	6, 11
3'	139.12	7.19, dd	2', 4' (11 Hz)	4', 5'	5'
4'	131.95	6.28, ddd	3', 5', 6' (1.3 Hz)	6'	
5'	136.91	6.08, m	4' (14.5 Hz), 6' (6.2 Hz)	3', 6'	3'
6'	18.54	1.83, dd	4', 5'	4', 5'	
1''	162.53				
2''	136.01	6.67, d	3'' (15.4 Hz)	1'', 3'', 4''	NH
3''	131.22	6.49, d	2''	1'', 2'', 4''	
4''	166.31				
1'-OH		16.60, s		1, 1', 2'	
NH		7.60, s		9, 10, 11, 1''	11, 2''

ESI-MS (in MeCN/H<sub>2</sub>O): m/z 418 [M+H]<sup>+</sup>, 459 [M+MeCN+H]<sup>+</sup>

FAB-MS (in 3-Nitrobenzylalkohol) : m/z 418 [M+H]<sup>+</sup>

UV/VIS (in Acetonitril/Wasser + 0.05% TFA): λ<sub>max</sub> [nm] 215, 271, 379

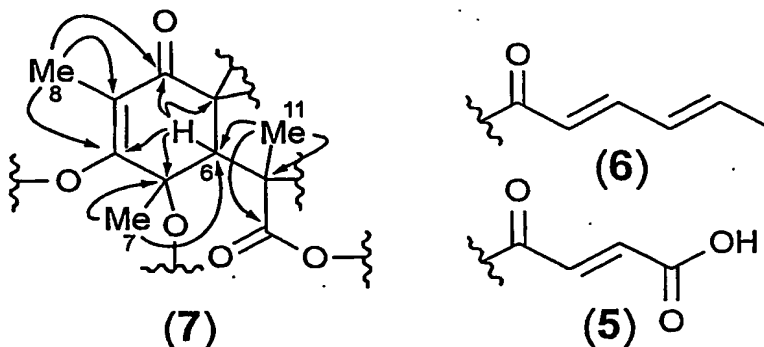




Sorbicillacton A

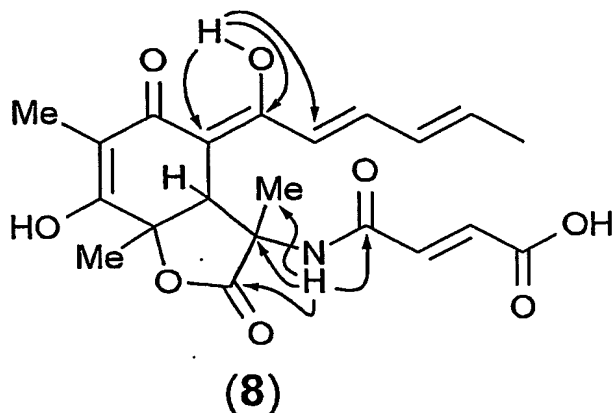
Die isolierte Verbindung, ein gelber, amorpher Feststoff, zeigt im ESI-MS ein  $[M+H]^+$ -Signal bei  $m/z = 418$ , die daraus resultierende Molekülmasse von 417 wird auch durch die FAB-MS-Messung bestätigt.

Aus den NMR-Daten, vor allem den HMBC- und COSY-Korrelationen, lassen sich zwei Teilstrukturen des Moleküls ableiten. Ein Fumaratrest (5), bei welchem die *E*-Konfiguration der Doppelbindung durch die hohe Kopplungskonstante (15.4 Hz) belegt wird, und ein Sorbylrest (6). Wie dieser an den Rest des Moleküls gebunden ist, bleibt zunächst noch unklar, die für C-1' gemessene chemische Verschiebung (169.7 ppm) läßt sowohl die Möglichkeit eines Sorbinsäureesters als auch die eines C-C-gebundenen Sorbylrests in Enolform offen. Das Substitutionsmuster des zentralen 6-Rings (7) ist über HMBC-Wechselwirkungen der drei Methylgruppen C-7, C-8 und C-11 sowie von H-6 zugänglich.

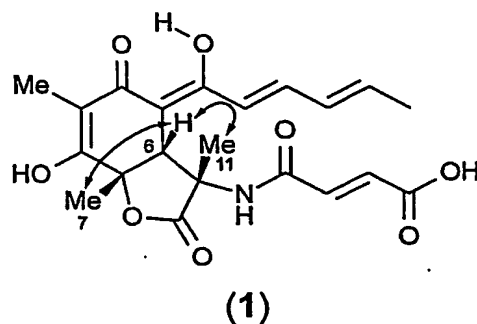
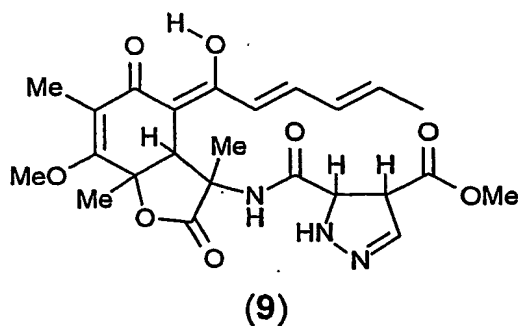


Die Durchführung der NMR-Messungen in THF- $d_8$  ermöglicht es, auch austauschbare Protonen und deren Wechselwirkungen zu beobachten.

Hierbei erkennt man zwei zusätzliche scharfe Signale im  $^1\text{H}$ -Spektrum, eine enolische Hydroxygruppe, die durch die Wasserstoffbrückenbindung zur  $\beta$ -ständigen Ketogruppe im Ring stark zu tiefem Feld verschoben ist (16.6 ppm), und ein amidisches Proton bei 7.6 ppm. Durch die HMBC-Korrelationen dieser Protonen können alle drei Teilstrukturen zu einer Gesamtstruktur (8) vereinigt werden.

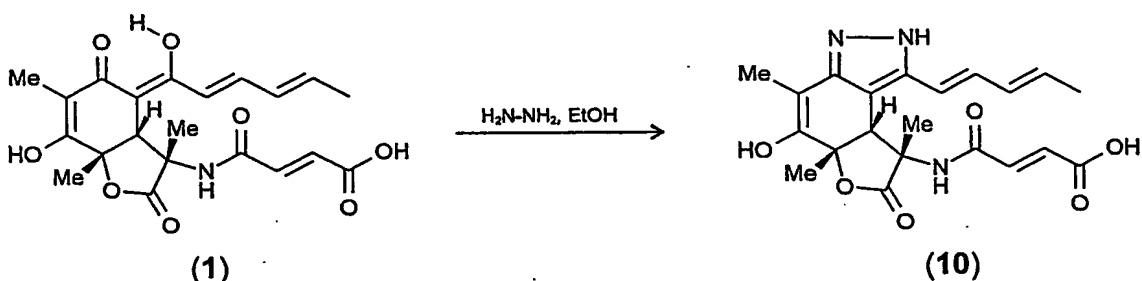


- 10 Zur Absicherung der Position des Lactonrings und der freien Säure- und Hydroxygruppen wurde der Naturstoff mit Diazomethan methyliert, wodurch ein dimethyliertes Derivat gebildet wurde, bei dem auch eine Cycloaddition von Diazomethan an die Doppelbindung des Fumaratrests stattgefunden hatte. NMR-Messungen an diesem Derivat führten zu der Struktur (9)
- 15 [Sorbicillacton-A-Derivat 1 (SOA-D1)], womit für den Naturstoff die Struktur (1) feststeht. Die relative Konfiguration der drei Stereozentren läßt sich durch ROESY-Wechselwirkungen bestimmen: Die Korrelationen von H-6 zu den Methylgruppen 7 und 11 beweisen, daß beide *cis*-ständig zu H-6 sind.



Auch die absolute Konfiguration des neuen Naturstoffes konnte aufgeklärt werden. Da es sich um einen völlig neuen Strukturtyp handelt, konnte hier nicht einfach eine Zuordnung durch Vergleich des CD-Spektrums mit dem einer strukturell verwandten konfiguratив bekannten Substanz vorgenommen werden. Die Zuordnung gelang aber durch Anwendung moderner quantenchemischer CD-Rechnungen, durch Simulation der für beide in Frage kommenden Enantiomeren zu erwartenden CD-Spektren und Vergleich dieser rechnerisch vorhergesagten Spektren mit dem tatsächlich für den Naturstoff experimentell gemessenen Spektrum. Durch diese Vorgehensweise wurde die vollständige absolute Stereostruktur von Sorbicillacton A wie in der Abbildung dargestellt etabliert.

### Beispiel 2: Derivatisierung von Sorbicillacton A zu Pyrazolderivaten



Zu einer Lösung von 100 mg Sorbicillacton A (1) in 2 ml Ethanol gibt man 10 mg Hydrazin. Nach 6 h Rühren bei Raumtemperatur verdampft man das Lösungsmittel. Die Aufreinigung des Rückstandes erfolgt mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: Dichlormethan-Methanol-Gemisch) und ergibt das gewünschte Pyrazolderivat (10).

### Beispiel 3: Biologische Eigenschaften der Verbindungen

#### a) Antitumorale Aktivität

Die antitumorale Aktivität von Sorbicillacton A und einem seiner Derivate (hier exemplarisch gezeigt an Derivat SOA-D1) wurde an einer Reihe von Tumortransformierten Zellen, wie den L5178y Mäuselymphomzellsystem (ATCC CRL 1722) getestet. Wie beschrieben (Müller et al. (1979) Cancer Res. 39: 1102-1107) wurden die Zellen in RPMI-Medium, dem 10% fötales Kälberserum zugesetzt worden war, kultiviert. Als Inokulumskonzentration

wurde 10.000 Zellen/ml gewählt. Zum Startzeitpunkt wurde die ausgewählte Substanz zugegeben und die Kultur 72 h inkubiert. Danach wurde die Anzahl der lebenden Zellen mittels des kolorimetrischen XTT-Ansatzes bestimmt und mit einem ELISA Reader ausgewertet (siehe: Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR (1988) Evaluation of a tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. Cancer Res 48: 4827-4833; Daum T, Engels J, Mag M, Muth J, Lücking S, Schröder HC, Matthes E, Müller WEG (1992) Antisense oligonucleotides: inhibitors of splicing of mRNA of human immunodeficiency virus. Intervirology 33: 65-75). Die optische Dichte der Kontrollen wurde als 100% definiert.

Verbindung	Konzentration der Verbindung (µg/ml)	Optische Dichte (595 nm)
Kontrolle	0	0,38
Sorbicillacton A	0,1	0,24
	0,3	0,19
	1,0	0,07
	3,0	0,06
SOA-D1	0,1	0,29
	0,3	0,22
	1,0	0,05
	3,0	0,03

*Ergebnis:* Es wird deutlich, daß bei den niedrigen Konzentration von > 0,1 µg/ml Sorbicillacton A und Derivate SOA-D1 die Zellproliferation nach 72 h entscheidend reduzieren. Die ED50-Konzentration (berechnet nach Sachs L. (1984) *Angewandte Statistik*. Springer, Berlin) lag bei den verwendeten L5178y Zellen bei 0,18 µg/ml.

Neben den Tumor-transformierten Zellen wurde der Einfluß der Verfahrensprodukte auch auf humane Vorhaut-Fibroblasten untersucht. Die Zellen und auch die Kultivierungsmethoden wurden früher beschrieben (siehe: Müller WEG, Maidhof A, Zahn RK, Schröder HC, Gasic MJ, Heidemann D,

Bernd A, Kurelec B, Eich E, Seibert G (1985) Potent antileukemic activity of the novel cytostatic agent avarone and its analogues *in vitro* and *in vivo*. Cancer Res. 45: 4822-4827). Zellen zwischen der 6. und 9. Passage wurden für die Versuche eingesetzt. Die Kultivierung wurde in Kollagen-beschichteten Plastikflaschen durchgeführt. Die Zellzahl wurde mikroskopisch bestimmt. Die Untersuchungen ergeben, daß das Sorbicillacton A bei einer Konzentration von 30 µg/ml keinen Effekt auf die Zellteilung ausüben.

#### b) Antivirale Aktivität

Eine ausführliche Angabe der Referenzen und der Durchführung der Methoden sind in früheren Arbeiten zusammengefaßt (Sarin PS, Sun D, Thornton A, Müller WEG (1987) Inhibition of replication of the etiologic agent of acquired immune deficiency syndrome (human T-lymphotropic retrovirus/lymphadenopathy-associated virus) by avarol and avarone. J Natl Cancer Inst 78: 663-666; Schröder HC, Sarin PS, Rottmann M, Wenger R, Maidhof A, Renneisen K, Müller WEG (1988) Differential modulation of host cell and HIV gene expression by combinations of avarol and AZT *in vitro*. Biochem Pharmacol 37: 3947-3952).

#### Untersuchungsparameter: Zellwachstum

H9-Zellen sowie mit HTLV-IIIB (HIV-1) infizierte H9-Zellen wurden in einer Konzentration von 0,2 x 1 000 000 Zellen/ml Kulturmedium zum Beimpfen eines Kulturmediums verwendet. Nach 4-tägiger Inkubation betrug die Dichte der H9-Zellen 1,3 x 1 000 000 Zellen/ml, während die Dichte der mit HTLV-IIIB infizierten H9-Zellen lediglich 0,6 x 1 000 000 Zellen/ml war, diese beiden Werte bildeten die Kontrollwerte.

Dann wurden Proben von H9-HTLV-IIIB-Zellen (0,2 x 1 000 000 Zellen/ml) 4 Tage mit unterschiedlichen Konzentrationen von Sorbicillacton A behandelt.

Es wurden folgende Ergebnisse erhalten:

Verbindung	Konzentration der Verbindung (µg/ml)	Zellkonzentration x 1 000 000 / ml
Kontrolle	0	0,62

Sorbicillacton A	0,1	0,68
	0,3	0,83
	1,0	1,39
	3,0	0,92

*Ergebnis:* Es ist ersichtlich, daß sowohl Sorbicillacton A in den Konzentrationen zwischen 0,3 und 3,0 µg/ml die Wachstumsrate von H9-HTLV-IIIB-Zellen auf Werte steigert, die im Bereich der Kontrolle, also H9-Zellen ohne HTLV-IIIB, liegen.

*Untersuchungsparameter: Produktion von Reverser Transkriptase*

Bei diesem Ansatz wird geprüft, in welchem Umfange die Verfahrensprodukte die Produktion von HIV(HTLV-IIIB)-Viren in H9-Zellen hemmen. Als Parameter für die Menge an Viren wurde die in diesen Partikeln vorhandene Reverse Transkriptase gemessen.

Untersucht wurde, in welchem Umfange nach einer 4-tägigen Gabe von Sorbicillacton A oder dem Sorbicillacton-A-Derivat zu H9-HTLV-IIIB-Zellen die Produktion von HTLV-IIIB (HIV-1)-Viren reduziert wird. Als Maß für die Virusmenge im Kulturmedium wurde die Reverse Transkriptase ausgewählt, d.h. die Hemmung der Reverse-Transkriptase-Produktion zeigt die Hemmung der Virusproduktion an. Die Ergebnisse sind in nachfolgender Tabelle zusammengestellt:

Verbindung	Konzentration der Verbindung (µg/ml)	Reverse Transkriptase Aktivität (100%)
Kontrolle	0	100
Sorbicillacton A	0,1	83
	0,3	28
	1,0	22
	3,0	14

*Ergebnis:* Es wird ersichtlich, daß im Überstand der H9-HTLV-IIIB-Zellen, die nicht mit Sorbicillacton A behandelt wurden, eine beträchtliche Reverse-

Transkriptase-Aktivität vorlag. Die Zugabe von Sorbicillacton A oder dem Sorbicillacton-A-Derivat führt zu einer dosisabhängigen Verringerung der Aktivität von Reverse Transkriptase im Überstand. Bereits bei einer Dosis von 0,1 µg/ml wurde eine beträchtliche Inhibierung beobachtet. Die  
5 erfindungsgemäß zur Anwendung kommenden Verbindungen sind deshalb in der Lage, die Virusreplikation beinahe vollständig zu inhibieren, in Konzentrationen, bei denen verschiedene *In-vitro*-Parameter, beispielsweise das Zellwachstum, praktisch nicht beeinflußt werden.

10 *Untersuchungsparameter: Expression der p24- und p15-Proteine*

Es hat sich gezeigt, daß Sorbicillacton A und das Sorbicillacton-A-Derivat SOA-D1 eine stark inhibierende Wirkung auf die Expression von HIV p24 (Gag-Protein) und p15 (Gag-Protein) in infizierten H9-Zellen besitzen. Wurden die target-H9-Zellen mit dem HIV(HTLV-III<sub>B</sub>)-Isolat und ohne die zu testende  
15 Verbindung kultiviert, kam es, wie mittels indirekter Immunfluoreszenz-Assays festgestellt werden konnte, zur Expression des p24- und p15-Proteins. Nach Inkubation der H9-HTLV-III<sub>B</sub>-Zellen mit den zu testenden Verbindungen wurde jedoch ein beinahe vollständiger Schutzeffekt beobachtet. Die Expression der p24- und p15-Proteine wurde bis auf 24% reduziert. Es  
20 wurden folgende Ergebnisse erhalten:

Verbindung	Konzentration der Verbindung (µg/ml)	Expression von p15 und p24 (in %)	
		p15	p24
Kontrolle	0	100	100
Sorbicillacton A	0,1	98	93
	0,3	65	42
	1,0	31	28
	3,0	47	24

*Ergebnis:* Es ist ersichtlich, daß Sorbicillacton A und das Sorbicillacton-A-Derivat (SOA-D1) eine signifikante Reduktion der Expression der HTLV-III<sub>B</sub> (HIV-1)-Proteine verursachen.  
25

#### **Beispiel 4: Effekt von Sorbicillacton A *in vivo***

Für diese Untersuchungen wurden männliche (outbred) NMRI-Mäuse (32-36g; Alter: 8-9 Monate) eingesetzt. Die Testsubstanz Sorbicillacton A wurde in Methylzellulose gelöst und den Tieren i.p. injiziert. Fünf Tage lang wurde eine  
5 Dosis von 20 mg/kg (pro Tag) den Tieren verabreicht. Nach der Behandlung wurde das Gewicht der Tiere bestimmt. Während dieser Zeit veränderte sich das Gewicht der Sorbicillacton-A-behandelten Tiere ( $33 \pm 4$  g) von denen der Kontrollen [nicht mit Sorbicillacton A behandelt] ( $35 \pm 4$  g) nicht signifikant. Keines der Versuchstiere starb.

10

*Ergebnis:* Aus diesen Daten wird geschlossen, daß die subakute Toxizität von Sorbicillacton A bei einer fünftägigen i.p.-Behandlung  $\gg 20$  mg/kg beträgt.

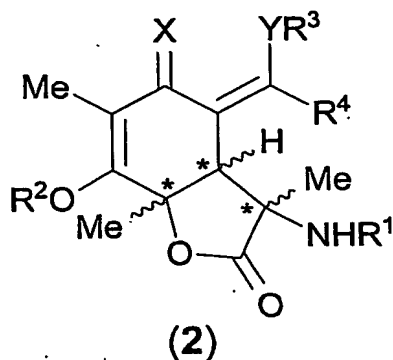
#### **Beschreibung der Synthese von Sorbicillacton A und deren Derivaten**

15 Sorbicillacton A und eine ganze Reihe struktureller Analoga lassen sich durch biomimetische Synthese, ausgehend von Sorbicillin und verwandten Verbindungen, durch oxidative Dearomatisierung und anschließende Addition von Alanin (im Falle von Sorbicillacton A) oder anderen Aminosäuren und deren Analoga und anschließende Anknüpfung von Fumarsäure (im Falle von  
20 Sorbicillacton A) oder analogen Acylresten in wenigen Schritten herstellen.



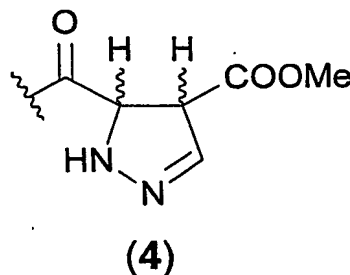
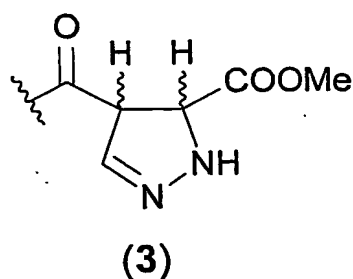
# Patentansprüche

## 1. Verbindung der allgemeinen Formel (2):



worin

$R^1$  ist ausgewählt aus:  $-H$ ,  $(C_1-C_{10})$ -Alkyl, wobei Alkyl gerade oder verzweigt ist,  $(C_3-C_{10})$ -Alkenyl oder eine Acylgruppe (z.B. Formyl, Acetyl, Trichloracetyl, Fumaryl, Maleyl, Succinyl usw.), wobei eventuelle freie  $-COOH$ -Gruppen an dieser Acylgruppe auch in Form von Estern (z.B. eines Methylesters,  $-COOMe$ ) vorliegen können oder  $R^1$  gegebenenfalls auch einer der beiden heterocyclischen Acylsubstituenten (3) oder (4) sein kann



$R^2$  ausgewählt ist aus:  $-H$ ,  $(C_1-C_{10})$ -Alkyl, wobei Alkyl gerade oder verzweigt ist oder einer Acylgruppe (z.B. Formyl, Acetyl usw.);

$R^3$  ausgewählt ist aus:  $-H$ ,  $(C_1-C_{10})$ -Alkyl, wobei Alkyl gerade oder verzweigt ist oder eine Acylgruppe (z.B. Formyl, Acetyl usw.);

$R^4$  ausgewählt ist aus:  $(C_1-C_{10})$ -Alkyl, wobei Alkyl gerade oder verzweigt ist oder  $(C_3-C_{10})$ -Alkenyl, wobei der Alkenylrest entweder eine oder mehrere Doppelbindungen enthalten kann;

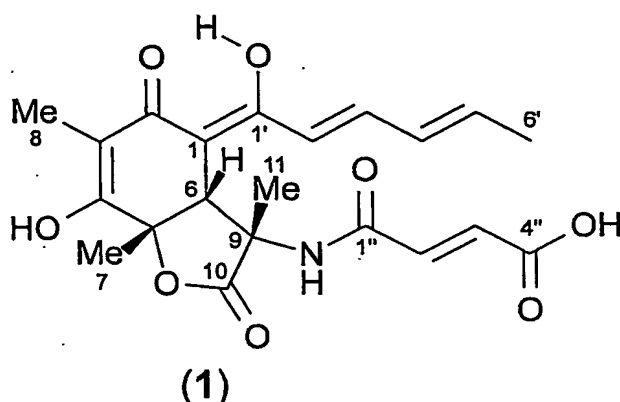
X ausgewählt ist aus O, S, NOH oder NOR<sup>5</sup>, wobei R<sup>5</sup> ein geradekettiges oder verzweigtes (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl ist;

Y entweder O ist oder Y und X sind zwei miteinander verbundene N-Atome, die somit einen Pyrazolring bilden.

- 5 und wobei die Verbindung als (R,R,R)-, (R,R,S)-, (R,S,R)-, (R,S,S)-, (S,R,R)-, (S,R,S)-, (S,S,R)- und (S,S,S)-Stereoisomer vorliegen kann und pharmazeutisch verträgliche Salze oder Solvate von (2).

2. Verbindung nach Anspruch 1 mit der Formel (1):

10



(Sorbicillacton A) oder Derivate davon, deren Diastereomere, sowie die entsprechenden Enantiomere und pharmazeutisch verträgliche Salze oder Solvate dieser Verbindung.

15

3. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung nach Anspruch 1 oder 2, umfassend Züchten eines Pilzes der Gattung *Penicillium*, insbesondere *Penicillium chrysogenum*, auf an sich bekannte Weise und Isolieren mindestens einer erfindungsgemäßen Verbindung aus dem Kulturmedium und/oder der Pilzbiomasse.

20

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Anzüchten des Pilzes in einem marinen Organismus, insbesondere dem marinen Schwamm *Ircinia fasciculata* (Porifera), erfolgt.

25

5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, weiterhin umfassend eine anschließende synthetische Derivatisierung der isolierten Verbindung.

6. Verfahren zur biomimetischen Synthese einer Verbindung nach Anspruch 1 oder 2, umfassend

- a) zur Verfügung stellen von Sorbicillin und/der Derivaten davon,
- b) oxidative Dearomatisierung und anschließende Addition von Alanin oder anderen Aminosäuren und deren Analoga, und
- c) anschließende Anknüpfung von Fumarsäure oder analogen Acylresten.

7. Verbindung nach Anspruch 1 oder 2 zur Verwendung zur Behandlung von Erkrankungen.

8. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine Verbindung nach Anspruch 1 oder 2 zusammen mit geeigneten Zusatz- oder Hilfsstoffen.

9. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung in Form einer Depotsubstanz oder als Vorläufer zusammen mit einer geeigneten, pharmazeutisch verträglichen Verdünnungslösung oder Trägersubstanz vorliegt.

10. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung in einer Menge von 20 µg vorliegt.

11. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung in einer Menge vorliegt, daß ein Konzentrationsbereich zwischen 0,3 und 3,0 µg/ml bei der Behandlung in vivo vorliegt.

12. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 8 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß sie weitere Chemotherapeutika enthält.

13. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 8 bis 12 in Form von Tabletten, Dragees, Kapseln, Tropflösungen, Suppositorien, Injektions- oder Infusionszubereitungen zur peroralen, rektalen oder parenteralen Verwendung.

14. Verwendung einer Verbindung nach Anspruch 1 oder 2 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Tumor- und/oder Viruserkrankungen und/oder zur Behandlung von Entzündungszuständen.

15. Verwendung nach Anspruch 14 in Form einer Depotsubstanz oder als Vorläufer zusammen mit einer geeigneten, pharmazeutisch verträglichen Verdünnungslösung oder Trägersubstanz.

16. Verwendung nach Anspruch 14 oder 15 zur Behandlung von HIV-1 in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,3 und 3,0 µg/ml.

17. Verwendung nach Anspruch 14 oder 15 zur Behandlung von Entzündungen in einer Konzentration von 2 µg/ml.

18. Verwendung nach Anspruch 14 oder 15 zur Behandlung der Ödembildung in einer Menge von 20 µg.

19. Verfahren zur Behandlung einer Erkrankung, ausgewählt aus Tumor- und/oder Viruserkrankungen und/oder Entzündungszuständen, umfassend Verabreichen einer Verbindung nach Anspruch 1 oder 2 oder einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach Anspruch 8 bis 13.

20. Verfahren nach Anspruch 19, umfassend Verabreichen der pharmazeutischen Zusammensetzung in Form einer Depotsubstanz oder als Vorläufer zusammen mit einer geeigneten, pharmazeutisch verträglichen Verdünnungslösung oder Trägersubstanz.

21. Verfahren nach Anspruch 19 oder 20, wobei die Viruserkrankung eine HIV-1 ist, und die Verbindung in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,3 und 3,0 µg/ml verabreicht wird.

22. Verfahren nach Anspruch 19 oder 20, wobei eine Entzündung behandelt wird, und die Verbindung in einer Konzentration von 2 µg/ml

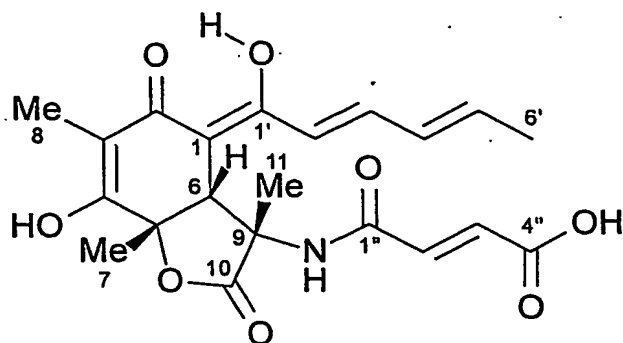
verabreicht wird.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 22, wobei eine  
Ödembildung behandelt wird, und die Verbindung in einer Menge von 20 µg  
5 verabreicht wird.

### Zusammenfassung

Es werden die Verbindungen Sorbicillacton A und Sorbicillacton-A-Derivate der allgemeinen Formel I

5



Sorbicillacton A

beschrieben, sowie Verfahren zu ihrer Herstellung. Sorbicillacton A und Sorbicillacton-A-Derivate haben in Zellkulturmodellen Antitumor- und antivirale Eigenschaften. Weiterhin besitzt Sorbicillacton A entzündungshemmende Eigenschaften. Schließlich wird die Synthese von Sorbicillacton A und deren Derivaten beschrieben.

10

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**